

TÍTULO DE PATENTE NO. 343244

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.
Domicilio: Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, 97200, Yucatán, MÉXICO
Denominación: MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL HONGO FITOPATÓGENO COLLETOTRICHUM CAPSICI UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).
Clasificación: Int.CI.8: C12N15/00; C12N15/09; C12N15/11; C12Q1/04; C12Q1/68
Inventor(es): CLAUDIA GUADALUPE TORRES CALZADA; RAÚL TAPIA TUSSELL; DAISY DE LA CARIDAD PÉREZ BRITO; ANDRÉS FELIPE DE JESÚS QUIJANO RAMAYO; INOCENCIO HIGUERA CIAPARA

SOLICITUD

Número:	Fecha de presentación:	Hora:
MX/a/2010/012061	4 de noviembre de 2010	15:33

PRIORIDAD

País:	Fecha:	Número:
-------	--------	---------

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 4 de noviembre de 2030

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/08/2010, 23/11/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 6º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 6º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 21 de octubre de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES



NAHANNY CANAL REYES



MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL HONGO FITOPATÓGENO
***COLLETOTRICHUM CAPSICI* UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE**
LA POLIMERASA (PCR).

5 **ANTECEDENTES.**

1. Campo de la invención.

La presente invención se refiere a novedosos iniciadores para usarse en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de antracnosis ocasionada por *Colletotrichum capsici*.

10

2. Antecedentes generales de la invención

De las enfermedades en plantas causadas por hongos, la antracnosis, ocasionada por las especies del género *Colletotrichum* es una de las más comunes y más importantes, debido a las pérdidas económicas que genera en diferentes cultivos alrededor del mundo (Freeman, 2000). *Colletotrichum capsici* es considerado como uno de los principales patógenos, ya que ocasiona serias pérdidas económicas en dos de los cultivos más importantes en México. En el cultivo de chile, se reporta una disminución de la producción de más del 50% (Pakdeevaporn *et al.*, 2005) y recientemente se reportó la presencia de este hongo en cultivos de papaya en Yucatán, Florida y en Trinidad y Tobago (Tapia-Tussell *et al.*, 2008; Tarnowski y Ploetz, 2010; Rampersad 2010, comunicación personal) por medio de la secuenciación de la región ITS del microorganismo.

Tradicionalmente la identificación de estos patógenos se hace con base en sus características morfológicas, pero esto puede ser tardado e inexacto, dado que se requiere experiencia en micología y en la identificación taxonómica. Además, se han reportado numerosos casos donde diferentes especies de *Colletotrichum* con características morfológicas similares han infectado a un solo hospedero (Martinez-

Culebras *et al.*, 2000; Peres *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006), lo cual hace que la identificación por estos métodos resulte difícil (Johnston and Jones, 1997).

Las técnicas moleculares han sido utilizadas tanto para la identificación rápida y efectiva de hongos fitopatógenos (Peres *et al.*, 2002; Cullen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 5 2008) como para su clasificación (Shenoy *et al.*, 2007). Para estos propósitos se usan las secuencias de ITS-5.8S del gen ADNr, a partir de las cuales se han desarrollado iniciadores de PCR especie-específicos para la detección de diferentes especies de *Colletotrichum* con propósitos de diagnóstico (Peres *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2005; 10 Chen *et al.*, 2006) o para análisis de filogenia (Talhinhas *et al.*, 2002). Sin embargo en el caso de *Colletotrichum capsici* no ha sido desarrollado hasta el momento ningún iniciador específico para su detección. Siendo los aquí presentados los primeros iniciadores específicos para identificar *Colletotrichum capsici*.

SUMARIO DE LA INVENCION

15 Un primer objeto de la invención consiste en proporcionar un método para identificar con exactitud y a una alta sensibilidad y en un tiempo corto al hongo *Colletotrichum capsici* (como responsable de la enfermedad o síntomas en una planta).

20 Un segundo objeto de la invención consiste en proporcionar un método para monitorear la enfermedad producida por *Colletotrichum capsici* en poblaciones del (los) cultivo(s) hospedero(s).

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un método para identificar y monitorear la enfermedad producida por *Colletotrichum capsici* en cultivos de chiles (*Capsicum sp*), papaya (*Carica papaya*) y cualquier otra especie de planta que resulte 25 hospedera del hongo *C. capsici*.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar secuencias de ADN iniciadoras y un Kit de diagnóstico para identificar al hongo fitopatógeno

Colletotrichum capsici por medio de técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los anteriores objetos se consiguen por medio de proporcionar iniciadores y un método para la detección de *Colletotrichum capsici* que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica de la planta de interés; (b) aislar ADN de dicha muestra biológica; (c) someter el ADN a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como iniciadores una secuencia sentido (SEQ ID NO. 1): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3' y una secuencia antisentido (SEQ ID NO. 2): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'; y (d) detectar a *Colletotrichum capsici* por visualización del producto de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A modo de ejemplo, se hace ahora referencia a los dibujos que se acompañan.

La FIG. 1 ilustra el sitio de unión de los iniciadores específicos (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2) en los nucleótidos 72-94 pb y 449-467 pb respectivamente, para las secuencias HM015005 y HM450130 de *Colletotrichum capsici*.

La FIG. 2A y 2B muestran tejidos de plantas de papaya (fruto y peciolo) infectados con los patógenos *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium sp.*

La FIG. 3 muestra el resultado de pruebas de especificidad con el juego de iniciadores SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 a partir del ADN del patógeno (*C. capsici*) cultivado en medio líquido.

La FIG. 4 ilustra el resultado de pruebas de especificidad con el juego de iniciadores SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 a partir de los ADN de tejido vegetal infectado.

La FIG. 5 ilustra el resultado de pruebas de sensibilidad con el juego de iniciadores SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 a partir de ADN del patógeno (*C. capsici*) a diferentes concentraciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO. 1. Oligonucleótido iniciador sentido

SEQ ID NO. 2 Oligonucleótido iniciador antisentido

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona secuencias de ADN únicas que son útiles para identificar al hongo fitopatógeno *Colletotrichum capsici* que ataca a diferentes cultivos entre los que destacan los chiles (*Capsicum spp*) y papaya (*Carica papaya L.*). Particularmente estas secuencias de ADN pueden ser utilizadas como iniciadores en análisis basados en la PCR para la identificación del patógeno mencionado. Las secuencias de ADN de esta invención incluyen las secuencias de los ITS del ADN ribosomal del patógeno específico.

La presente invención que provee un método para la detección de un hongo fitopatógeno comprende los siguientes pasos:

15 (a) obtener una muestra biológica de la planta de interés;

(b) aislar ADN de dicha muestra biológica;

(c) someter el ADN a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como iniciadores una secuencia sentido (SEQ ID NO. 1): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3' y una secuencia antisentido (SEQ ID NO. 2): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'; y

20 (d) detectar a *Colletotrichum capsici* por visualización del producto de amplificación de la reacción de cadena de polimerasa.

Diseño de iniciadores especie-específicos

25 Para el diseño de los iniciadores específicos para el hongo fitopatógeno *Colletotrichum capsici* se obtuvieron las secuencias reportadas en el GenBank de las regiones ITS-5.8S del ADNr para esta especie y a partir de la información obtenida se realizó un alineamiento para generar una secuencia consenso con el programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999).

De la misma manera, se obtuvieron las secuencias de las regiones ITS del ADN de diferentes especies de *Colletotrichum* y se generó una secuencia consenso para cada una de ellas. Las especies utilizadas fueron:

- 5 *C. acutatum/ G. acutata* (AM991136.1, AM991135.1, FJ746691.1, EU770251.1, EU770245.1, EF464591.1, FJ938294.1, EU523539.1, FJ810515.1, FJ228184.1, AB458671.1, AB458666.1, AB458663.1, EF694682.1, EF694677.1, AB444085.1, EF622186.1, EU131882.1, FJ455521.1, FJ478085.1, EU886753.1, EF593369.1, EU727318.1, AY770556.2, DQ463362.1, AY376518.1, EU016517.1, DQ177875.1, 10 AY769517.1, DQ286126.1)
- C. ampelinum* (EU520091.1, EU622247.1)
- C. boninense* (FJ904824.1, EF221828.1, FJ441663.1, FJ441628.1, EU822805.1, EU822802.1, EU822801.1, EU294267.1, EU294266.1, AY376525.1, AY376524.1, AY376523.1, AY376522.1, EF503672.1, DQ286170.1, DQ286168.1, DQ286162.1, 15 DQ415655.1, DQ415652.1, AY438552.1, AY438547.1, AY438544.1, AB051404.1)
- Colletotrichum capsici* (GQ214220.1, EU056740.1, EU056739.1, EU056738.1, EF016304.1, EF016303.1, EF016302.1, EF016301.1, EF016300.1, EF016299.1, EF016297.1, EU979361.1, EU400139.1, EU781666.1, EF608048.1, EF608049.1, EU315004.1, EF458676.1, EF458672.1, AY376526.1, EF458675.1, EF458674.1, 20 EF458673.1, EF458671.1, EF458670.1, EF556207.1, EF468496.1, DQ454028.1, DQ454027.1, DQ454026.1, DQ454024.1, DQ454017.1, DQ454016.1, DQ454015.1, DQ454014.1, DQ454013.1, DQ453990.1, DQ453989.1, DQ453988.1, DQ453987.1, DQ286156.1, EF025976.1, EF025975.1, EF025974.1, DQ415651.1, DQ415650.1, DQ415649.1, DQ415648.1, DQ195689.1, DQ195688.1, DQ195687.1, DQ195686.1, 25 DQ195685.1, DQ195684.1, DQ195683.1, DQ195682.1, DQ195681.1, DQ195680.1)
- C. cereale* (EU554157.1, EU554156.1, EU554153.1, EU554152.1, EU554151.1, EU554150.1, EU554149.1, EU554148.1, EU554147.1, EU554146.1, EU554144.1, EU554143.1, EU554141.1, EU554102.1, EU554095.1, EU554087.1, DQ126239.1, DQ126238.1, DQ126186.1)

- C. dematium (AB455254.1, AB196301.1, AB196300.1, AB196299.1, AB196298.1,
 AB334523.1, EU554176.1, EU554175.1, EU554174.1, EU554166.1, EU554165.1,
 EU554164.1, EU554163.1, EU554162.1, EU554161.1, EU554160.1, EU400142.1,
 EF608050.1, AY376531.1, AY177331.1, AF411773.1, DQ195699.1, DQ195698.1,
 5 DQ195697.1, DQ195696.1, DQ195695.1, DQ195694.1, DQ195693.1, AB046607.1,
 AB046608.1)
- C. destructivum (AB458662.1, AB334522.1, EF016298.1, EU400156.1, EU400143.1,
 EU070913.1, EU070912.1, EU070911.1, AB354932.1, AJ558106.1, AB105959.1,
 AB105962.1, AB105961.1, AB105960.1, AB105958.1, AF320564.1, AF320563.1,
 10 AF320562.1, AF451908.1)
- C. fragariae (FJ746686.1, FJ810510.1, FJ172290.1, DQ003093.1, DQ003092.1,
 EU605880.1, EU408784.1, EU408783.1, EU408782.1, AY605089.1, AF411771.1,
 AF411767.1, DQ868498.1, DQ868497.1, AY841137.1, AJ536223.1, AJ536222.1,
 AJ536221.1, AF090854.1, AB087221.1)
- 15 C. fuscum (AB105966.1, AB105965.1, AB105964.1, EU886770.1, EU400144.1)
- C. gloeosporioides (FJ940901.1, FJ940735.1, FJ940734.1, AB470844.1, AB470833.1,
 AB470881.1, AB470867.1, FJ884081.1, FJ823432.1, FJ823431.1, EU530697.1,
 FJ624257.1, FJ515006.1, FJ515005.1, FJ539190.1, FJ539189.1, FJ539187.1)
- 20 C. graminicola (Z33377.1, Z32982.1, Z32981.1, Z32980.1, Z32979.1, Z32978.1,
 Z32977.1, Z32976.1, Z32975.1, Z32974.1, Z32973.1, Z32972.1)
- C. lini (EU732726.1, EU520210.1, EU400148.1)
- C. linicola (EU000060.1, AB057437.1, AB046609.1)
- C. lupini (EU589451.1, DQ286120.1, DQ286117.1, DQ174694.1, DQ174693.1,
 DQ174692.1, AJ301968.1, AJ301933.1, AJ301934.1, AJ301930.1, AJ301923.1,
 25 AJ301918.1)
- C. musae (DQ003095.1, EU400149.1, DQ453986.1, DQ453985.1, DQ453984.1,
 DQ453983.1, DQ453982.1, AY567968.1, AY266401.1, AY266399.1, AY266397.1,
 AY266396.1, AB087220.1)
- C. ricini (EU520162.1, EU520064.1)

C. sublineolum (EU554155.1, EU554117.1, EU554116.1, EU554094.1, EU554093.1,
 AB439813.1, DQ003117.1, DQ003116.1, DQ003115.1, DQ003114.1, DQ003113.1,
 EU400151.1, AY376542.1, DQ126262.1, DQ126261.1, DQ195716.1, AJ301978.1)
C. truncatum/ G. truncata (AY266386.1, AY266380.1, FJ172231.1, FJ172229.1,
 5 FJ172228.1, FJ172226.1, FJ172230.1)

Entre paréntesis se indican los números de accesión en el GenBank de las secuencias utilizadas para generar la secuencia consenso de cada especie.

A partir del alineamiento de estas secuencias consenso, se encontraron dos
 10 regiones comprendidas entre 65-90 pb y 480-500 pb, que mostraron la variabilidad
 necesaria para diferenciar a *Colletotrichum capsici* del resto de las especies, las cuales
 se utilizaron para el diseño del juego de iniciadores. Ambos iniciadores fueron
 sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa).

En la figura 1, se muestran las secuencias HM015005 y HM450130 de *C.*
 15 *capsici* y las posiciones de nucleótidos donde anclan los iniciadores sentido (**SEQ ID
 NO. 1**) en 72-94 pb y el antisentido (**SEQ ID NO. 2**) en 449-467 pb.

Las características de dichos iniciadores se presentan a continuación:

Secuencias de los Iniciadores:

- 20 ✓ Sentido (**SEQ ID NO. 1**): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3'
 Contenido de GC: 55%
 ✓ Antisentido (**SEQ ID NO. 2**): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'
 Contenido de GC: 52.6%

25 **EJEMPLO 1. VALIDACIÓN DE LOS INICIADORES *IN SILICIO***

Mediante el empleo del Programa Primer3 v 0.4.0 (Rozen *et al.*, 2000) se probaron los iniciadores obtenidos contra todas las secuencias consenso generadas y sólo reconocieron (se pegaron) a la secuencia de la especie *Colletotrichum capsici*

indicando el tamaño del fragmento que se obtendría al realizar la amplificación *in vitro* (394 pb).

En la figura 1 se muestra el sitio de unión de los iniciadores específicos (SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2) para las secuencias HM015005 y HM450130 de *Colletotrichum capsici*, en los nucleótidos 72-94 pb y 449-467 pb respectivamente.

EJEMPLO 2. VALIDACIÓN DE LOS INICIADORES *IN VITRO*

En la siguiente tabla se muestra la lista de las especies de hongos utilizados a partir de cultivos puros, para la validación *in vitro* y su fuente.

10

Espece	No de Accesoión	Fuente
<i>Colletotrichum capsici</i>	ATCC 48574	<i>Capsicum annuum</i>
	HM450127	<i>Tithonia rotundifolia</i>
	HM015005	<i>Carica papaya</i>
	HM450126	<i>Jatropha curcas</i>
	HM450128	<i>Carica papaya</i>
	HM450129	<i>Carica papaya</i>
	HM450130	<i>Carica papaya</i>
	HM450131	<i>Capsicum annuum</i>
	HM450132	<i>Capsicum annuum</i>
	HM562705	<i>Citrus limonium</i>
	HM562706	<i>Capsicum annuum</i>
	HM562707	<i>Capsicum annuum</i>
	HM562708	<i>Jatropha curcas</i>
HM562709	<i>Carica papaya</i>	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM562710	<i>Carica papaya</i>
	HM562711	<i>Carica papaya</i>
	HM562712	<i>Mangifera indica</i>
	HM562713	<i>Persea americana</i>



Especie (Cont.)	N de Accesoión	Fuente (Cont.)
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	CBS 131.57	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Colletotrichum graminicola</i>	CBS 113173	<i>Zea mays</i>
<i>Corynespora cassiicola</i>	GU461299	<i>Carica papaya</i>
	GU461301	<i>Carica papaya</i>
<i>Trametes hirsuta</i>	GQ280373	Madera en descomposición
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	GQ280374	Madera en descomposición
<i>Cochliobolus lunatus</i>	GQ280375	Desechos de <i>Agave fourcroydes</i>
<i>Bipolaris sp</i>	GQ280376	Desechos de <i>Agave fourcroydes</i>
<i>Athelia rolfsii</i>	-	Desechos de <i>Agave fourcroydes</i>
<i>Alternaria sp</i>	-	<i>Tagetes erecta</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	<i>Zea mays</i>

Todas estas especies de hongos fueron crecidas de 7 a 10 días en medio líquido Caldo nutritivo NB. El micelio obtenido fue utilizado para la extracción de ADN genómico según el protocolo de Tapia-Tussell *et al.*, 2006.

- 5 Como resultado, con el uso de los iniciadores de la invención, solamente respondieron (amplificaron) a la reacción en cadena de la polimerasa las muestras de *Colletotrichum capsici*, pero no las relativas a las demás especies.

10 **EJEMPLO 3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON LOS INICIADORES ESPECÍFICOS DE *COLLETOTRICHUM CAPSICI*:**

Se validaron los iniciadores específicos para *Colletotrichum capsici*, mediante reacciones de PCR punto final con las siguientes condiciones:

Volumen de reacción 25 µl:

Reactivos	Concentración final
Buffer PCR 5 X	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.5 mM
dNTPs mix 10 mM	0.20 mM
Iniciador (SEQ ID NO. 1) 10 pmoles	1.0 pmol
Iniciador (SEQ ID NO. 2) 10 pmoles	1.0 pmol
Taq DNA 5 U/µl	1.25 U
H ₂ O libre de endonucleasas	Completar a 25 µl
ADN	1 ng

Perfil térmico:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 min.	1
94	30 seg.	25
62	30 seg.	
72	2 min.	
72	7 min.	1

5 El producto de amplificación fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en buffer Tris-Borato-EDTA 1X (TBE), a 90 Volts por 45 minutos. La banda obtenida a la altura de 394 pb (figura 3) indicó la presencia de *Colletotrichum capsici*. Sólo amplificaron los ADN procedentes de *Colletotrichum capsici*.

10 La figura 3 muestra las pruebas de especificidad con el juego de iniciadores SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 a partir de los ADN obtenidos del cultivo en medio líquido del patógeno. En donde:

M: marcador molecular (1 kb DNA ladder);

líneas 1 y 19: Control positivo, *Colletotrichum capsici* ATCC 48574;

líneas 2-17 y 20-24: *Colletotrichum capsici*;

líneas 18 y 42: Agua (H₂O_{dd}), [A];

5 líneas 25-28: Control negativo, *C. gloeosporioides*, [B];

línea 29: Control negativo, *C. dematium* ATCC 200634, [C];

línea 30: Control negativo, *C. lindemuthianum* CBS 131.57, [D];

línea 31: Control negativo, *C. graminicola* CBS 113173, [E];

líneas 32-33: Control negativo, *C. cassicola*, [F];

10 líneas 34-41: Controles negativos, *Trametes hirsuta*, *Phanerochaete chrysosporium*,
Cochliobolus lunatus, *Athelia rolfsii*, *Bipolaris sp.*, *Alternaria sp.*, *Rhizoctonia solani*,
Fusarium oxysporum, [G].

15 Para validar la especificidad de los iniciadores diseñados, el producto de
amplificación obtenido con este juego de iniciadores (figura 3) fue purificado y
secuenciado en Macrogen, Inc. (Corea). Las secuencias obtenidas fueron alineadas
con la base de datos del GenBank usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997)
obteniéndose en todos los casos un 100% de identidad con las especies reportadas
como *Colletotrichum capsici*, lo cual valida la especificidad de estos iniciadores.

20 La figura 4 ilustra las pruebas de especificidad con el juego de iniciadores SEQ
ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 a partir de los ADN de tejido vegetal infectado de plantas de
papaya. En donde:

M: marcador molecular (100 pb DNA ladder);

línea 1: Control positivo *Colletotrichum capsici* ATCC 48574;

línea 11: Agua (H₂O_{dd}), [A];

25 líneas 2-4: frutos;

líneas 5-7: peciolo;

líneas 8-10: hojas.



5 **EJEMPLO 4. SINTESIS Y PURIFICACION DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS**

Los oligonucleótidos SEQ ID NO. 1 Y SEQ ID NO. 2, pueden ser sintetizados por diferentes compañías, por ejemplo, Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa).

EJEMPLO 5. VALIDACIÓN EN CAMPO

10 Se colectaron en campo muestras biológicas de la planta de papaya con los síntomas de antracnosis y se llevaron al laboratorio donde se les realizó la detección usando los iniciadores según lo descrito en el ejemplo 3 y se pudo identificar el patógeno en dichas muestras.

15 Las figuras 2a y 2b muestran fotografías de tejidos de plantas de papaya (fruto y peciolo) infectados con los patógenos *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium sp.*

EJEMPLO 6. EXTRACCIÓN DE ADN *Carica papaya*

20 Se tomó tejido infectado de diferentes órganos de plantas de papaya infectados (frutos, peciolos, hojas). En el caso del fruto y del peciolo se encontraban presentes otros patógenos de papaya, identificados por métodos tradicionales como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium sp.* La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tapia-Tussell *et al.*, 2005.

El proceso de extracción comprende las etapas de:

- 25 (a) tomar una muestra de una planta o un tejido de la planta o una parte de la planta
(b) adicionar un volumen (mL) de buffer de extracción al tejido de la siguiente manera:

Tejido: 30-40 mg

Buffer: 2 mL



Buffer de extracción: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 700 mM NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0),

1% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (w/v), 140 mM β -

5 mercaptoethanol. La muestra es macerada hasta que el tejido se ha roto lo suficiente para liberar ADN del hongo.

(c) una vez terminada la maceración, se transfiere el extracto a un tubo eppendorf.

(d) la muestra es calentada a 65°C por 15 minutos

(e) el extracto se deja enfriar a temperatura ambiente y se le adicionan 600 μ L de
10 cloroformo, mezclando suavemente

(f) el extracto es centrifugado a 15682 g por 10 minutos

(g) la fase acuosa de esta extracción es transferida a un tubo de microcentrífuga nuevo y se añade 1 vol. de isopropanol frío

(h) después de incubar a -80°C por 10 min, la muestra se centrifuga a 15682 g por 5
15 minutos

(i) el sobrenadante es eliminado y el precipitado se lava con 500 μ L de etanol al 70%. El etanol es eliminado, dejando secar el precipitado.

(j) la pastilla es resuspendida en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM NaCl).

20 Como será obvio a un técnico en la materia, la misma metodología se emplea también para identificar *Colletotrichum capsici* en especies que resulten hospederas del patógeno, por ejemplo, en chiles (especies *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*) (Shenoy *et al.*, 2007; Than *et al.* 2008), y otras especies como Piñón (*Jatropha curcas*), Limón (*Citrus limonium*), Pitahaya (*Hylocereus undatus*) entre
25 otras.

EJEMPLO 7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE LOS INICIADORES:

Para llevar a cabo esta prueba se realizaron diferentes diluciones sucesivas a partir de una solución de 100 ng/ μ l de ADN genómico de *Colletotrichum capsici*, se utilizó como control negativo H₂O. Las diluciones empleadas fueron las siguientes:

- | | | |
|---|--------------------|--------------------|
| 5 | 1. 100 ng/ μ l | 5. 10 pg/ μ l |
| | 2. 10 ng/ μ l | 6. 1 pg/ μ l |
| | 3. 1 ng/ μ l | 7. 100 fg/ μ l |
| | 4. 100 pg/ μ l | 8. 10 fg/ μ l |

10 La reacción de PCR y la visualización del producto de amplificación en todos los casos se llevaron a cabo según las condiciones descritas en el acápite de validación de los iniciadores *in vitro* y se obtuvieron amplificaciones hasta la dilución de 10 pg/ μ l (ver Línea 5, figura 5).

15 En la figura 5. se ilustra la prueba de sensibilidad con el juego de iniciadores SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 2 a partir de ADN del patógeno (*C. capsici*) a diferentes concentraciones, en donde:

M: Marcador molecular Escalera de 100 pb,

1 a 8: diluciones de 100 ng/ μ l a 10 fg/ μ l de ADN de *Colletotrichum capsici*,

9: control negativo.

20 Los iniciadores específicos para *Colletotrichum capsici* que aquí se presentan son los primeros que se han generado con este objetivo y tienen una gran aplicación para la detección y diagnóstico del hongo fitopatógeno *Colletotrichum capsici*, tanto en un laboratorio de servicios de diagnóstico como de investigación, lo cual favorece el mantenimiento de la sanidad vegetal de los cultivos afectados por este patógeno,
25 ya que una detección rápida permitiría tomar medidas de control y evitaría las grandes pérdidas económicas que este patógeno ocasiona.

Este desarrollo permite identificar con exactitud y con una alta sensibilidad (concentración de 10 pg/ μ l de ADN del hongo), en aproximadamente 24 horas, si el hongo responsable de la enfermedad (o síntomas en la planta) es *Colletotrichum capsici* y por lo tanto tomar las medidas correctas para su control y/o manejo fitosanitario. También permite monitorear la enfermedad en poblaciones del (los) cultivo(s) hospedero(s).

1.- Un juego de iniciadores específicos para la detección basada en amplificación de *Colletotrichum capsici* que consiste de:

- 5
- una secuencia sentido (*SEQ ID NO. 1*): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3'; y
 - una secuencia antisentido (*SEQ ID NO. 2*): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'.

2.- El juego de iniciadores específicos para la detección basada en amplificación de *Colletotrichum capsici* de conformidad con la reivindicación 1, en donde la secuencia
10 sentido (*SEQ ID NO. 1*) tiene un contenido de GC: 55% y la secuencia antisentido (*SEQ ID NO. 2*) tiene un contenido de GC: 52.6%.

3.- Un método para la detección de *Colletotrichum capsici* en una planta de papaya (*Carica papaya*), chiles (*Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*),
15 Piñón (*Jatropha curcas*), Limón (*Citrus limonium*), Pitahaya (*Hylocerus undatus*) u otra planta presuntamente infectada con *Colletotrichum capsici*, **caracterizado porque comprende las etapas de:**

- a. obtener una muestra biológica de la planta presuntamente infectada con *Colletotrichum capsici*;
- 20 b. aislar ADN de dicha muestra biológica;
- c. someter el ADN a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como iniciadores
 - una secuencia sentido (*SEQ ID NO. 1*): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3', y
 - 25 - una secuencia antisentido (*SEQ ID NO. 2*): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'; y
- d. detectar el *Colletotrichum capsici* por visualización del producto de amplificación en la reacción de cadena de la polimerasa.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 3, en donde la muestra biológica de la planta se selecciona del grupo que comprende: hojas, frutos, tallos, peciolo, flor y semilla y combinaciones de las mismas.

5

5.- El método de conformidad con la reivindicación 3, en donde la amplificación del ADN mediante PCR utiliza entre 1.0 pmol y 10 pmoles de cada iniciador y al menos 1 ng de ADN genómico en 25 o 50 μ L de volumen de reacción.

10 6.- El método de conformidad con la reivindicación 3, en donde la amplificación del ADN mediante PCR utiliza un perfil térmico de: (a) un ciclo de 5 min a 95°C; (b) 25 ciclos de 30 s a 94°C, (c) un ciclo de 30 s a 62°C, (d) un ciclo de 2 min a 72°C y (e) un ciclo de 7 min a 72°C.

15 7.- Un kit de diagnóstico para la detección de *Colletotrichum capsici*, que comprende como iniciadores:

- una secuencia sentido (SEQ ID NO. 1): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3' , y

- una secuencia antisentido (SEQ ID NO. 2): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'.

20

25

RESUMEN



Se describen iniciadores, Kit de detección y método para la detección de *Colletotrichum capsici* que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica de la planta de interés; (b) aislar ADN de dicha muestra biológica; (c) someter el ADN a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como iniciadores una secuencia sentido (SEQ ID NO. 1): 5'-GTA GGC GTC CCC TAA AAA GG-3' y una secuencia antisentido (SEQ ID NO. 2): 5'-CCC AAT GCG AGA CGA AAT G-3'; y (d) detectar el *Colletotrichum capsici* por visualización del producto de amplificación de la reacción de cadena de polimerasa.

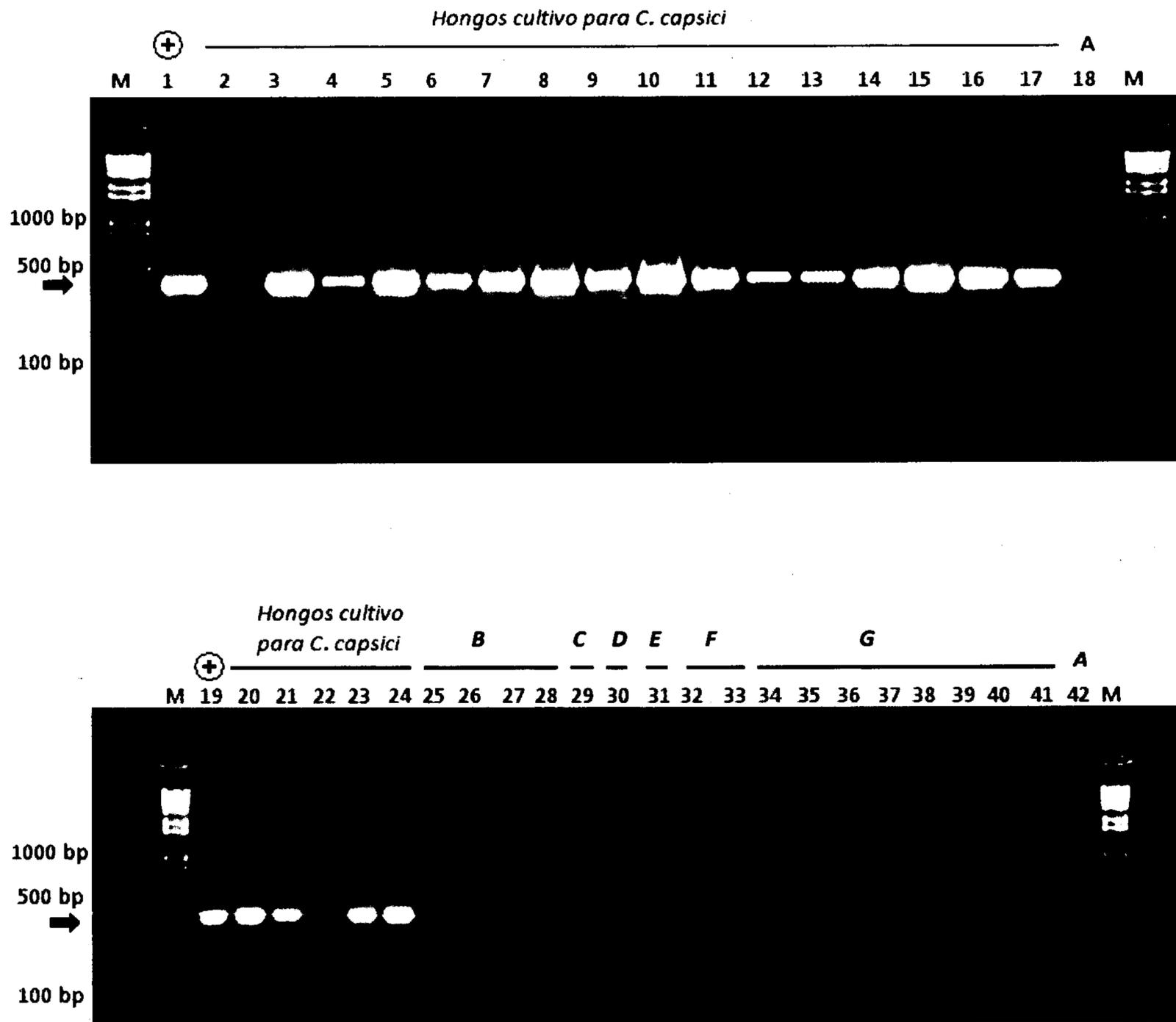


FIG. 3

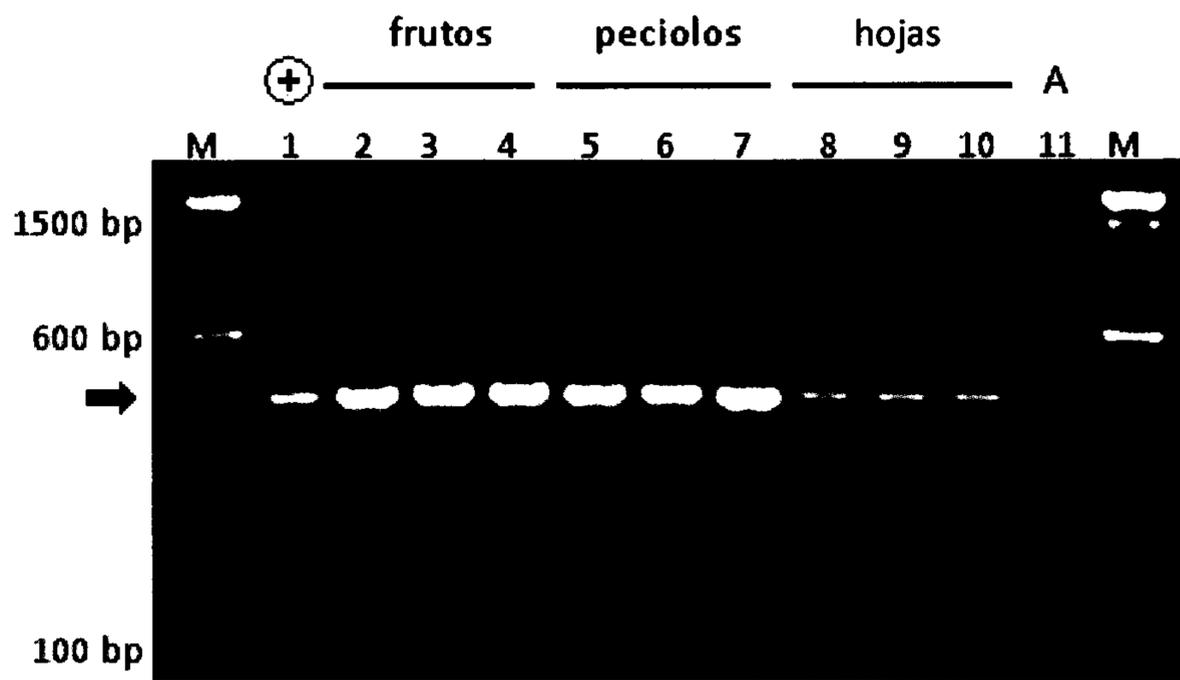


FIG. 4

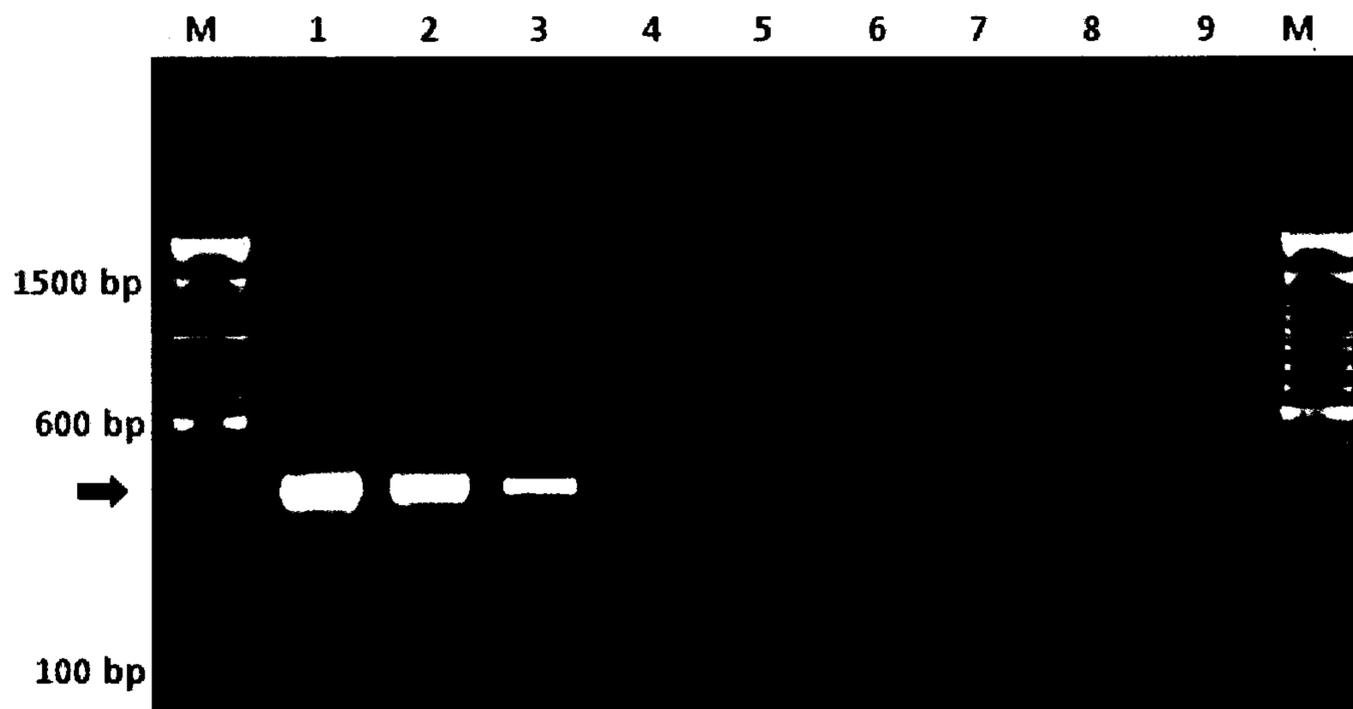


FIG. 5